

Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

---

# Eindimensionale Dünnschichtchromatographie von Tryptophanmetaboliten im Harn bei Leberkrankheiten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Friedrich Del Barba  
aus Solingen

Marburg 1978



Aus der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

---

# Eindimensionale Dünnschichtchromatographie von Tryptophanmetaboliten im Harn bei Leberkrankheiten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Friedrich Del Barba  
aus Solingen

Marburg 1978

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Universität Marburg am 14.7.1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. A. Enghardt

Correferent: Prof. Dr. Kaffarnik



| Inhaltsverzeichnis                                                     | Seite |
|------------------------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung                                                             |       |
| 1. Die klinische Bedeutung der Bestimmung<br>von Tryptophanmetaboliten | 3-5   |
| 2. Tryptophanmetabolite bei Leberkrankheiten                           | 5     |
| 3. Nachweismethoden für Tryptophanmetabolite                           | 6     |
| Methodik                                                               |       |
| 1. Reagentien und Material                                             | 7     |
| 2. Sammeln der Harnproben                                              | 8     |
| 3. Extraktion                                                          | 8     |
| 4. Chromatographie                                                     | 9-10  |
| 5. Untersuchtes Patientengut                                           | 11    |
| Diskussion zur Methode                                                 |       |
| 1. Extraktion                                                          | 11    |
| 2. Chromatographie                                                     | 12    |
| 3. Farbreaktionen                                                      | 12-16 |
| 4. Wiederauffindung                                                    | 16-20 |
| Ergebnisse                                                             |       |
| 1. Ergebnisse der chromatographischen Auftren-<br>nung                 | 21    |
| 2. Das Spektrum der Indolderivate im mensch-<br>lichen Harn            | 21-22 |
| 3. Indolderivate bei Leberkrankheiten                                  | 22-28 |

|                           | Seite |
|---------------------------|-------|
| 4. Kasuistiken            | 29-30 |
| Diskussion der Ergebnisse | 31-33 |
| Zusammenfassung           | 34-35 |
| Literaturverzeichnis      | 36-40 |

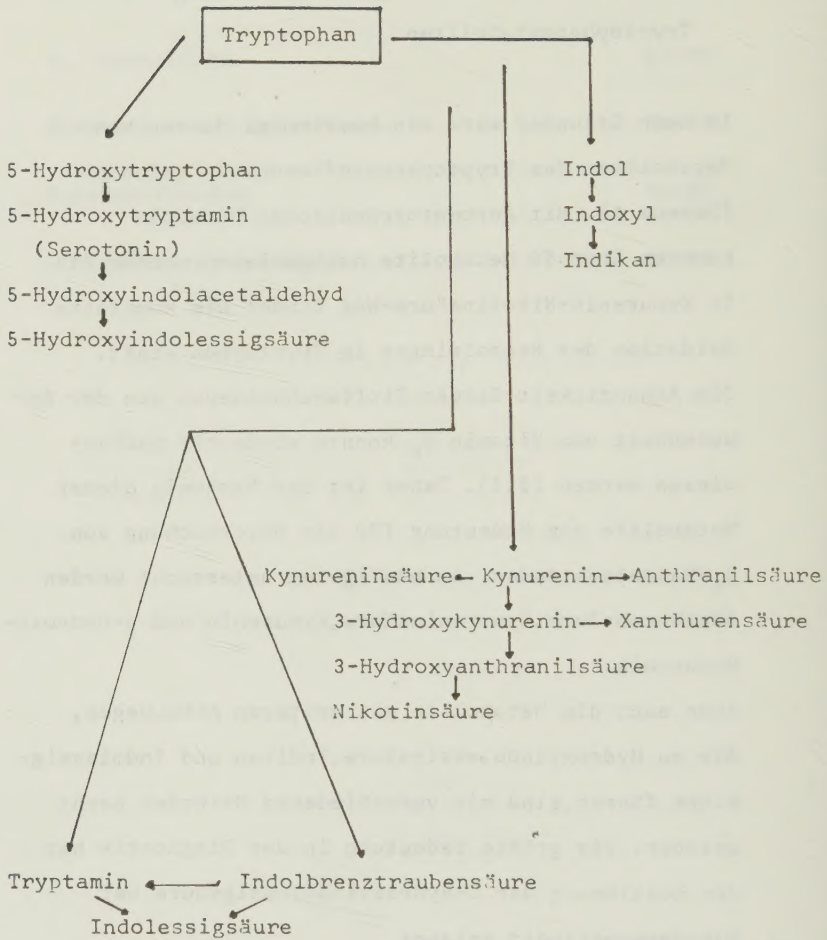
## 1. Die klinische Bedeutung der Bestimmung von Tryptophanmetaboliten

Im Harn Gesunder wird ein bestimmtes Muster von Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels gefunden (Schema 1). Mit chromatographischen Methoden konnten über 50 Metabolite nachgewiesen werden (1). Im Kynurenin-Nikotinsäure-Weg findet die komplette Oxidation des Benzolringes im Tryptophan statt. Die Abhängigkeit dieses Stoffwechselweges von der Anwesenheit von Vitamin B<sub>6</sub> konnte eindeutig nachgewiesen werden (2,3). Daher ist der Nachweis dieser Metabolite von Bedeutung für die Untersuchung von B<sub>6</sub>-Mangelzuständen. Am häufigsten untersucht werden Xanthurensäure, Kynureninsäure, Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin.

Aber auch die Metabolite des weiteren Abbauweges, die zu Hydroxyindolessigsäure, Indikan und Indolessigsäure führen, sind mit verschiedenen Methoden nachweisbar. Die größte Bedeutung in der Diagnostik hat die Bestimmung der 5-Hydroxyindolessigsäure bei Dünndarmcarcinoid erlangt.

Einzelne Indolmetabolite werden bei bestimmten angeborenen Stoffwechselkrankheiten vermehrt im Harn gefunden, z.B. bei Phenylketonurie (12,14), Hartnupscher Erkrankung (4,12) und Alkaptonurie (23).

Ein Abbaupfad des Serotonins führt zu den Methoxyindolen, von denen das Methoxy-5-Tryptamin im Harn



Schema Nr. 1

Abbauwege des Tryptophans mit Metaboliten von  
klinisch-diagnostischer Bedeutung

bei rheumatischen Erkrankungen und exanthematischen Infektionskrankheiten erhöht gefunden wurde (27). Eine vermehrte Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten wurde auch bei verschiedenen anderen Erkrankungen festgestellt und von Dalgliesh und Tekman auf das begleitende Fieber zurückgeführt (5). Bei Brustkrebs wird sie als Zeichen einer vermehrten Östrogenaktivität gewertet (6). Stachow et al. (14) stellten bestimmte Quotienten von Tryptamin zu 5-Hydroxyindolessigsäure im Urin bei Phenylketonurie, Dünndarmcarcinoid und bei bestimmten Dermatosen fest.

## 2. Tryptophanmetabolite bei Leberkrankheiten

Bei Leberkrankheiten liegen einzelne Beobachtungen vor, die dafür sprechen, daß verschiedene Haupt- und Nebenwege des Tryptophanabbaues mehr oder weniger stark gestört sind. dies ist theoretisch zu erwarten, da die meisten Schritte des Tryptophanabbaues in der Leber ablaufen (1,7).

Eine Störung des Abbaues zur Nikotinsäure ist durch mehrere Befunde gesichert. Bei der experimentellen Virushepatitis bei Mäusen fand Piazza eine vermehrte Ausscheidung von Kynurenin, Hydroxykynurenin, Xanthurensäure und Acetylkynurenin (8). Hartmann fand eine vermehrte Ausscheidung von Xanthurensäure, Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure bei Leberkrank-

heiten und nahm eine Störung im letzten Schritt zur Nikotinsäurebildung an.

Die Ergebnisse über das Verhalten des Serotoninstoffwechsels bei Leberkranken sind aber widersprüchlich. Einige Auroren berichten über eine verminderte Ausscheidung von 5-Hydroxyindolessigsäure (9), Hydroxytryptophan (10), und Serotonin (1), von anderen aber wurde die 5-Hydroxyindolessigsäure-Ausscheidung bei Leberkranken erhöht gefunden (2).

Hartmann (1) fand eine Reihe von Metaboliten im Urin Leberkranker neu auftretend oder vermehrt, im Praecoma einzelne vermehrt, andere vermindert oder fehlend. Eine sichere Korrelation zum klinischen Verlauf konnte nicht gefunden werden.

### 3. Nachweismethoden für Tryptophanmetabolite

Als Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Tryptophanmetabolite wurden Papierchromatographie (1,4,12,13,20,30), Elektrophorese (15), Säulenchromatographie (10,18), Ultrafiltration (19), sowie ein- und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (6,21-27) angewandt. Eigene Untersuchungen wurden mit ein- und zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten durchgeführt. Ziel der eigenen Untersuchungen war, zu prüfen, ob das Auftreten einzelner neu oder vermehrt gefundener Tryptophanmetabolite als Zeichen einer beginnenden Leberdekompensation

gelten kann und diagnostische Rückschlüsse erlaubt.  
Es sollte geprüft werden, ob es möglich ist, mit der  
relati einfachen qualitativen Dünnschichtchromato-  
graphie das methodische Spektrum zur Untersuchung  
der Leberinsuffizienz zu ergänzen.



## Methodik

### 1. Reagentien und Material

Zur Anfertigung der Standardlösungen wurden folgende Reinsubstanzen verwandt:

DL-Tryptophan, DL-5-Hydroxytryptophan, Tryptamin, Serotonin-Kreatininsulfat, 3-Indolessigsäure, Indolpropionsäure, Indolacrylsäure, 5-Hydroxyindolessigsäure, Indolmilchsäure, Indolcarbonsäure, N-Acetyltryptophan, Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure, Hippursäure, Citrullin, Indol, 5-Hydroxykynurenin, Indoxylsulfat. Alle diese Substanzen waren im Handel erhältlich (Merck AG, Darmstadt; Fluka AG Buchs, Schweiz).

Die Substanzen wurden in 50 proz. Isopropanol gelöst (1 mg/ml). Für Substanzmischungen wurden bis zu acht verschiedene Reinsubstanzen in Mengen von je 1 mg in 1 ml 50 proz. Isopropanol gelöst. Die Lösungen wurden tiefgekühlt bei  $-20^{\circ}$  aufbewahrt. Es wurden Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0.25 mm, Größe 20 x 20 cm verwendet (Macherey, Nagel und Co., Düren: DC-Fertigplatten SIL G UV 254). Zum Auftragen wurden Mikrokapillaren benutzt (Microcaps, Shandon und Co., Frankfurt).

Die Entwicklung der Substanzflecke erfolgte mit folgenden Sprühreagentien:

#### a) Van Urk-Reagenz

1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml HCl/  
Äthanol (50 ml 36 proz. HCl und 50 ml Äthanol abs,)

b) Xanthydrol-Reagenz

1 g Xanthydrol in 10 ml Methanol gelöst wurde in Ampullen von Merck bezogen. 1 ml dieser Lösung wurde mit 90 ml Äthanol abs. und 10 ml 36 proz. HCl gemischt.

c) Zimtaldehyd-Reagenz

5 ml Zimtaldehyd (Merck) wurden in 100 ml Äthanol abs. gelöst und 5 ml 36 proz. HCl hinzugefügt.

d) Prochazka-Reagenz

20 ml 35 proz. Formaldehyd-Lösung wurden mit 20 ml 25 proz. HCl und 40 ml Äthanol abs. gemischt.

2. Sammeln der Harnproben

24-Stundenharn wurde entweder sofort untersucht oder mit 32 proz. HCl auf pH 1.0 gebracht und bei  $-20^{\circ}$  eingefroren.

3. Extraktion

Zur Extraktion wurden 5-10 ml Harn eingesetzt. Diese wurden mit 32 proz. HCl auf pH 1.0 gebracht und anschließend mit Ammonsulfat gesättigt. Anschließend wurde das dreifache Volumen Äthylacetat zugefügt. Nach gründlichem Schütteln in einem Schütteltrichter für etwa zehn Minuten wurden die Phasen durch zentrifugieren bei etwa 5000 Um getrennt. Die obere Phase

wurde vollständig in einen Soritzkolben überführt (Äthylacetatphase) und im Rotavapor bei 40° zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 0.5 ml 50 proz. Isopropanol aufgenommen. Davon wurden 5 µl zur aufsteigenden eindimensionalen Dünnschichtchromatographie verwendet.

#### 4. Chromatographie

Es wurden Kieselgelplatten in der Größe von 20 x 20 cm mit einer Schichtdicke von 0.25 mm benutzt.

5 µl Harnextrakt und 1-5 µl der Standardlösungen wurden mit Mikrokapillaren aufgetragen.

Die Proben wurden bei eindimensionaler Chromatographie bandförmig (1 cm), bei zweidimensionaler Chromatographie punktförmig (Durchmesser 0.7 cm) im Abstand von 1.5 cm vom unteren Rand der Platte aufgetragen und vor der Chromatographie getrocknet.

Laufmittel:

A. Benzol-Propionsäure-H<sub>2</sub>O (Bz-Pro-H<sub>2</sub>O 40:40:20)

B. Methylacetat-Propanol-Ammoniak 96 proz.

(Me-Pr-NH<sub>3</sub> 45:35:20)

C. Chloroform-Essigsäure 96 proz. (Chl-Ac 95:5)

Die Chromatogramme wurden in Simultan-Trennkammern (Desaga, Heidelberg) entwickelt. Das Laufmittel wurde 10 Minuten vor der Chromatographie in die Tanks zur Äquilibrierung eingebracht. Die Trennung erfolgte

aufsteigend meist eindimensional in drei Kammern mit den drei angegebenen Laufmitteln A,B und C. In einzelnen Versuchen wurde zweidimensional, und zwar in der ersten Richtung mit dem Laufmittel B, in der zweiten Richtung mit dem Laufmittel C getrennt. Steighöhe war in beiden Richtungen 10 cm. Die Laufzeit betrug bei Laufmittel A eine Stunde, bei Laufmittel B 50 Minuten, bei C 90 Minuten. Vor dem Besprühen wurden die Platten sorgfältig getrocknet, um eine Verfärbung der Sorptionsschicht durch das jeweilige Sprühreagenz zu vermeiden, und unter UV-Licht betrachtet.

Bei Entwicklung mit Van Urk-Reagenz wurden die Platten bis zur Transparenz besprüht und nach dem Trocknen für zwei Minuten in einen Tank mit Königswasserdämpfen eingestellt.

Bei Entwicklung mit Xanthydrol-Reagenz wurde die Platte nach dem Besprühen und Antrocknen bei 105° bis zur maximalen Farbentwicklung erhitzt.

Bei Entwicklung mit Zimtaldehyd-Reagenz wurde die Platte nach Besprühen und Antrocknen für drei Minuten in eine Kammer mit Salzsäuredämpfen eingebracht.

Nach dem Besprühen mit Prochazka-Reagenz wurden die Chromatogramme für eine Minute in eine Kammer mit Königswasserdämpfen eingestellt und dann im UV-Licht betrachtet.

## 5. Untersuchtes Patientengut

Es wurden Harnproben von 10 Gesunden, 27 Patienten mit chronischer Hepatitis oder kompensierter Lebercirrhose, 12 Patienten mit akuter Virushepatitis, 11 Patienten mit portocavaler Encephalonathie Stadium 1-3 und drei Patienten mit portocavaler Anastomose untersucht. Bei einer Reihe von ihnen wurden Verlaufskontrollen durchgeführt. Die Diagnosen waren durch eingehende klinische und klinisch-chemische Untersuchungen gesichert.

## Diskussion zur Methode

### 1. Extraktion

Unbehandelte Urine zur Chromatographie von Tryptophan-Nikotinsäuremetaboliten wurden von Walsh verwendet (24). In eigenen Untersuchungen waren die Flecken ohne Vorextraktion nicht gut aufgetrennt oder zuschwach erkennbar. Lediglich N-Acetyltryptophan konnte bei terminaler Leberinsuffizienz ohne Vorextraktion nachgewiesen werden.

Mit der kombinierten sauren und basischen Extraktion nach Armstrong (12) konnten weniger Indolkörper im Harn nachgewiesen werden als mit der Extraktion nach Sorice et al. (13). Mit der Methode nach Dalliesh (20), bei der die Indole an Kohle adsorbiert und eluiert werden, wurde die Beurteilung der Chromatogramme durch Kohleverunreinigungen erschwert.

Nach Sprince et al. (13) kann der größte Teil der Indolkörper nach Extraktion mit Äthylacetat wieder aufgefunden werden. Diese Beobachtung konnte bestätigt werden. In eigenen Untersuchungen wurde daher diese Methode angewendet.

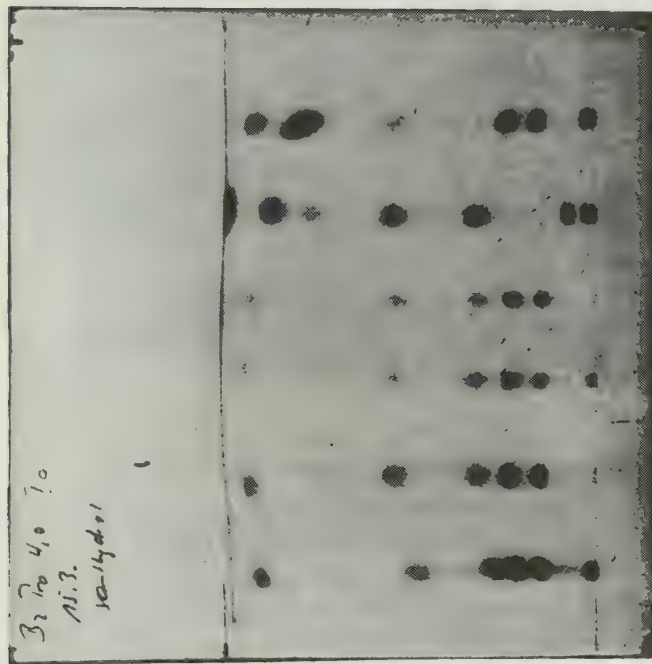
## 2. Chromatographie

Stahl (21) schlägt für die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Indole die Laufmittel B und C vor. Das basische Laufmittel B zeichnet sich durch gute Trenneigenschaften, aber hohe Variabilität der Rf-Werte aus. Laufmittel C lässt bei gut reproduzierbaren Rf-Werten einige wichtige Substanzen an der Auftragstelle zurück. Laufmittel A zeigt gute Trennqualität und reproduzierbare Rf-Werte (Abb. 1-3).

## 3. Farbreaktionen

Mit der Van Urk-Färbung ergeben die Tryptophanderivate mit Indolkern blaue und violette Farbtöne. Nichtcyklische Tryptophanderivate, wie z.B. Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure ergeben gelbe und orangefarbene Flecken. Gelb erscheint ebenfalls der Harnstoffleck. Eine deutliche Anfärbung der nichtcyklischen Derivate konnte man mit der Xanthhydrol-Färbung erhalten.

Die Färbung nach Prochazka ergibt schwache gelbliche Flecken. Im UV-Licht lassen sich aber geringe



Indol  
Indolcarbonsäure  
3-Indolesigsäure  
3-Indolacrylsäure

3-Hydroxyanthranilsäure

5-Hydroxyindolesigsäure

Indolmilchsäure

N-Acetyltryptophan

Tryptamin

5-Hydroxytryptamin

Tryptophan

Serotonin

Abb. I Verschiedene Gemische von Reinsubstanzen

Laufmittel: Bz-Pro-H<sub>2</sub>O

Färbung: Xanthydrol

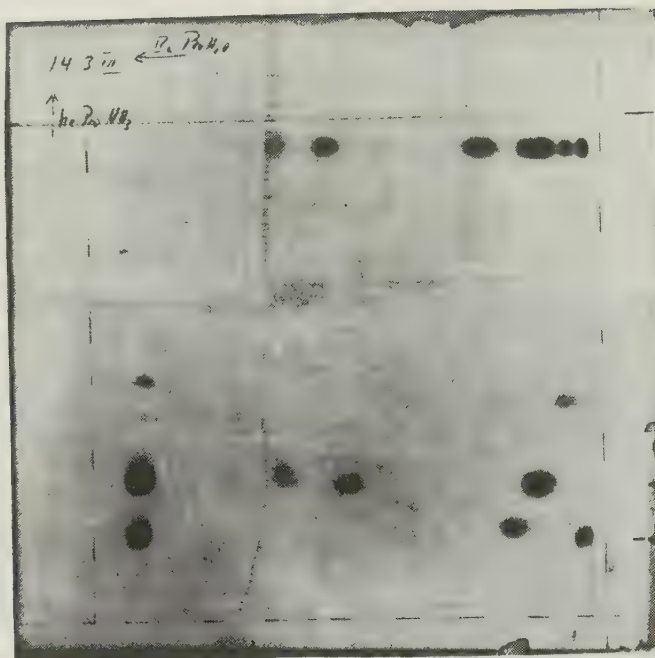


Abb. 2 Zweidimensionales Chromatogramm von neun verschiedenen Reinsubstanzen  
(Nr. I, II, III, VII, VIII, X, XII, XV, XVII nach Tab. 1)  
Laufmittel:  $\text{Me-Pr-NH}_3$  /  $\text{Bz-Pro-H}_2\text{O}$   
Färbung: Van Urk-Reagenz

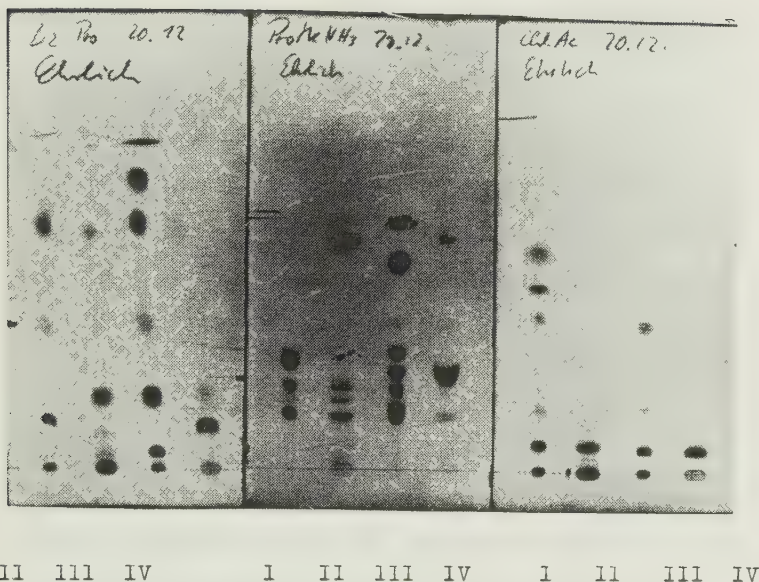


Abb. 3 Chromatographie von Reinsubstanzen und Harnextrakten in verschiedenen Laufmitteln. Entwicklung mit van Urä-Reagenz  
 I: Reinsubstanzgemisch wie in Abb. 1  
 III: Reinsubstanzgemisch der Substanzen I, VI, XI und XII (nach Tab. 1)  
 II und IV: Harnextrakte von Patienten mit portocavaler Encephalopathie

Konzentrationen einzelner Metabolite besser erkennen als mit den übrigen Färbemethoden. Im Ganzen hat sich die Van Urk-Färbung als die günstigste erwiesen. Die Empfindlichkeit dieser Farbreaktion liegt für die meisten gefundenen Substanzen bei  $0.1/\mu\text{g}$ . Die Xanthhydrol- und die Zimtaldehyd-Färbung waren ähnlich empfindlich. Mit Prochazka-Reagenz konnte man im UV-Licht Mengen dieser Substanzen bis zu  $0.01/\mu\text{g}$  nachweisen (Tab. 1).

#### 4. Wiederauffindung

Wir prüften die Wiederauffindung der von uns gefundenen Substanzen mit unserer Extraktionsmethode durch Zugabe von Reinsubstanzen zum Urin und anschließender Extraktion. Abb. 4 und Tabelle 2 zeigen, daß die Wiederauffindung für die einzelnen Substanzen unterschiedlich ist. Sie ist für einige Substanzen so gut (Antirranilsäure, Indolacrylsäure,  $\beta$ -Indoleessigsäure, N-Acetyltryptophan), daß eine quantitative Bestimmung sinnvoll erscheint.

Tabelle 1

R<sub>F</sub>-Werte und Farbreaktionen der untersuchten Substanzen

| Nr. | Substanz                     | R <sub>F</sub> $\overset{\text{A}}{\text{\AA}}$ | R <sub>F</sub> B <sup>+</sup> | R <sub>F</sub> C <sup>+</sup> | Farbe mit<br>Van Urk-Reagenz | UV  |
|-----|------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----|
| 1   | DL-Tryptophan                | 0.01                                            | 0.38                          | -                             | blaugrün                     | (+) |
| 2   | DL-5-Hydroxy-<br>tryptophan  | 0.03                                            | 0.22                          | -                             | blau                         | (+) |
| 3   | Tryptamin                    | 0.05                                            | 0.87                          | 0.01                          | blauviolett                  | -   |
| 4   | Serotonin                    | 0.02                                            | 0.75                          | -                             | blau                         | -   |
| 5   | 3-Indolessigsäure            | 0.77                                            | 0.45                          | 0.49                          | blauviolett                  | (+) |
| 6   | Indolpropionsäure            | 0.88                                            | 0.6                           | 0.53                          | blau                         | -   |
| 7   | Indolacrylsäure              | 0.9                                             | 0.59                          | 0.47                          | blau                         | -   |
| 8   | 5-Hydroxyindol<br>essigsäure | 0.3                                             | 0.31                          | 0.08                          | lila                         | -   |
| 9   | Indolmilchsäure              | 0.22                                            | 0.57                          | 0.07                          | blau                         | -   |
| 10  | Indolcarbonsäure             | 0.9                                             | 0.52                          | 0.49                          | violett                      | -   |
| 11  | N-Acetyltryptophan           | 0.16                                            | 0.58                          | 0.06                          | blau                         | -   |
| 12  | Anthranilsäure               | 0.85                                            | 0.59                          | 0.07                          | gelb                         | ++  |
| 13  | 3-Hydroxy-<br>Anthranilsäure | 0.5                                             | 0.33                          | 0.17                          | orange                       | ++  |
| 14  | Hippursäure                  | -                                               | -                             | -                             | -                            | -   |
| 15  | Indol                        | 0.98                                            | 0.95                          | 0.8                           | violett                      | -   |
| 16  | 5-Hydroxy-<br>Kynurenin      | -                                               | -                             | -                             | -                            | -   |
| 17  | Indoxylsulfat                | -                                               | 0.75                          | -                             | braun                        | (+) |

+ Laufmittel

A Benzol/Propionsäure/H<sub>2</sub>O 40:40:20

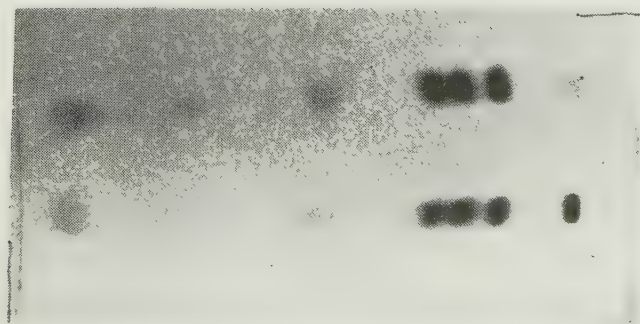
B Methylacetat/Propanol/Ammoniak 45:35:20

C Chloroform/Essigsäure 36% 95:5

Fortsetzung Tabelle 1

| Nr. | Farbe mit<br>Xanthydrol-R. | Farbe mit<br>Prochazka-R. | Farbe mit<br>Zimtaldehyd | Fluoreszenz mit<br>Prochazka-R. |
|-----|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 1   | orangebraun                | ocker                     | braun                    | gelb                            |
| 2   | orange                     | gelb                      | graubraun                | gelb                            |
| 3   | orange                     | gelb                      | graubraun                | gelb                            |
| 4   | violett                    | gelb                      | braun                    | gelb                            |
| 5   | lila                       | gelbbeige                 | graubraun                | gelbgrün                        |
| 6   | lila                       | gelb                      | grau                     | gelb                            |
| 7   | leuchtendblau              | gelbbeige                 | braungrün                | gelbgrün                        |
| 8   | lila                       | gelbbeige                 | orangebraun              | dunkelblau                      |
| 9   | violett                    | gelb                      | graubraun                | gelb                            |
| 10  | lila                       | gelb                      | braun                    | gelb                            |
| 11  | lila gelb                  | gelb                      | braun                    | gelb                            |
| 12  | gelb                       | hellbeige                 | ocker                    | blau                            |
| 13  | gelborange                 | gelb                      | ocker                    | blaugrau                        |
| 14  | -                          | -                         | -                        | -                               |
| 15  | violett                    | violett                   | braungrau                | dunkelblau                      |
| 16  | -                          | -                         | -                        | -                               |
| 17  | graublau                   | braun                     | braun                    | braun                           |

Tryptophan



5-Hydroxytryptophan

5-Hydroxytryptophan

5-Hydroxytryptophan  
Indol-3-pyruvate

5-Hydroxytryptophan

5-Hydroxytryptophan  
Tryptophan

Abb. 4 Wiederfindung von in Vers.  
gelösten Reinstoffen (1 µg/ml  
Harn)

I: ohne Extraktion  
II: nach Extraktion

Tabelle 2

Wiederauffindung von Tryptophanmetaboliten nach Äthylacetat-extraktion von Harnextrakten

| Substanz                 | Wiederauffindung | Variationsbreite |
|--------------------------|------------------|------------------|
| 5-Hydroxyindolessigsäure | 81%              | 74-84%           |
| 3-Indolessigsäure        | 94%              | 92-98%           |
| Indol                    | 87%              | 82-97%           |
| Tryptamin                | 10%              | 3-17%            |
| Anthranilsäure           | 100%             | 96-102%          |
| 3-Hydroxyanthranilsäure  | 68%              | 59-83%           |
| Indoxylsulfat            | 29%              | 20-37%           |
| Tryptophan               | 12%              | 4-21%            |
| 5-Hydroxytryptophan      | 10%              | 3-18%            |
| Indolacrylsäure          | 93%              | 83-95%           |
| Indolmilchsäure          | 70%              | 64-80%           |
| Serotonin                | 46%              | 32-64%           |
| Indolcarbonsäure         | 87%              | 80-91%           |
| N-Acetyltryptophan       | 94%              | 86-100%          |

## Ergebnisse

### 1. Ergebnisse der chromatographischen Auftrennung

Bei der Untersuchung der Harnextrakte liessen sich 18 Indolderivate identifizieren (Tab. 1). Die Charakterisierung erfolgte durch Vergleich mit Rf-Werten und Farbreaktionen von Reinsubstanzen. Substanzen, die eindimensional nicht aufgetrennt werden konnten, wurden mit zweidimensionaler Chromatographie nach der angegebenen Methode identifiziert. Die Trennungen waren in den einzelnen Laufmitteln verschieden: Gleiche Rf-Werte fanden sich im Laufmittel A (Bz-Pro-H<sub>2</sub>O) für Indolacrylsäure und Indolcarbonsäure, sehr niedrige Rf-Werte hatten Tryptophan, Hydroxytryptophan und Serotonin. In Laufmittel B (Me-Pr-NH<sub>3</sub>) waren eindimensional wenig aufgetrennt: Anthranilsäure, 3-Indolpropionsäure, Indolacrylsäure und N-Acetyltryptophan. In Laufmittel C (Chl-Ac) blieben sechs Substanzen an der Auftragsstelle zurück (Tab. 1). Insgesamt erwies sich Laufmittel A als am besten geeignet. Die schwer trennbaren Indolderivate Indolacrylsäure und Indolpropionsäure sind keine regelmässig im Harn auftretenden Metabolite. Für den Nachweis von Serotonin eignet sich das Laufmittel B besser, allerdings ist der Serotoninnachweis wegen der Verluste bei der Extraktion nicht optimal.

### 2. Das Spektrum der Indolderivate im menschlichen Harn

Regelmässige Metabolite im Harn Gesunder, die sich mit

dieser relativ einfachen Methode auftrennen lassen, sind: 5-Hydroxyindolessigsäure, 3-Indolessigsäure, Tryptophan, Serotonin, Indoxylsulfat. Nicht regelmäßig finden sich 5-Hydroxytryptophan und Anthranielsäure (Abb. 5).

### 3. Indolderivate bei Leberkrankheiten

Bei Lebererkrankungen traten einige typische Substanzen neu oder vermehrt auf (Tab. 3).

Bei der akuten Virushepatitis konnten keine besonderen Veränderungen in der Metabolitausscheidung festgestellt werden.

Die kompensierte Lebercirrhose zeigte als neu auftretende Substanzen besonders die Indolmilchsäure und die 3-Hydroxyvanthranielsäure. In zwei Fällen konnten geringe Mengen von N-Acetyltryptophan nachgewiesen werden. Die Ausscheidung von Serotonin ist deutlich herabgesetzt. Der typische Metabolit bei Praecoma und portocavaler Anastomose ist das N-Acetyltryptophan. Diese Substanz konnte nicht nur qualitativ bei allen Fällen von Praecoma nachgewiesen werden, sondern wurde auch in Vergleich zur kompensierten Lebercirrhose in viel größeren Mengen ausgeschieden (Abb. 6-8). Bei den untersuchten Patienten mit portocavaler Anastomose wurde die Substanz N-Acetyltryptophan immer stark vermehrt gefunden (Abb. 9).

Die nachfolgenden Kasuistiken zeigen das Auftreten von N-Acetyltryptophan in Verbindung mit weiteren Laborbefunden und klinischen Symptomen bei portocavaler Anastomose.

Tabelle 3

Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Tryptophan-metabolite in bestimmten Stadien von Lebererkrankungen (Angaben in Anzahl der Patienten, bei denen die Substanzen nachgewiesen werden konnten. n=Gesamtzahl der Patienten)

| Substanz                  | 1(n=10) | 2(n=12) | 3(n=27) | 4(n=11) | 5(n=3) |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|
| N-Acetyltryptophan        | -       | -       | 2       | 11      | 3      |
| Indolmilchsäure           | -       | 1       | 24      | 11      | 3      |
| 5-Hydroxyindol-essigsäure | 10      | 12      | 27      | 11      | 3      |
| Indoxylsulfat             | 10      | 12      | 27      | 11      | 3      |
| Indol                     | 10      | 12      | 27      | 11      | 3      |
| Serotonin                 | 10      | 10      | 13      | 6       | -      |
| Indolpropionsäure         | -       | 1       | -       | -       | -      |
| Indolcarbonsäure          | -       | -       | -       | -       | -      |
| 3-Idolessigsäure          | 10      | 10      | 27      | 11      | 3      |
| Tryptophan                | 10      | 12      | 24      | 9       | 3      |
| 3-Hydroxyanthranilsäure   | -       | -       | 23      | 11      | 3      |
| 3-Hydroxytryptophan       | 5       | 7       | 10      | 4       | 3      |
| Indolacrylsäure           | -       | -       | -       | -       | -      |
| Anthranilsäure            | 6       | 8       | 26      | 10      | 3      |

Kollektiv 1: Normalpersonen

Kollektiv 2: akute Virushepatitis

Kollektiv 4: portocavale Encephalopathie

Kollektiv 3: chronische Hepatitis-Cirrhose

Kollektiv 5: portocavale Anastomose

Abb. 5 Chromatogram von Benzoldestenz-  
gemischen (I, II, III: 70, 2 und 10% Benzol)  
wie in Abb. 4) und von Formal-  
dehyd-Extrakt (II, III)

Indol

Tryptophan

Serotonin

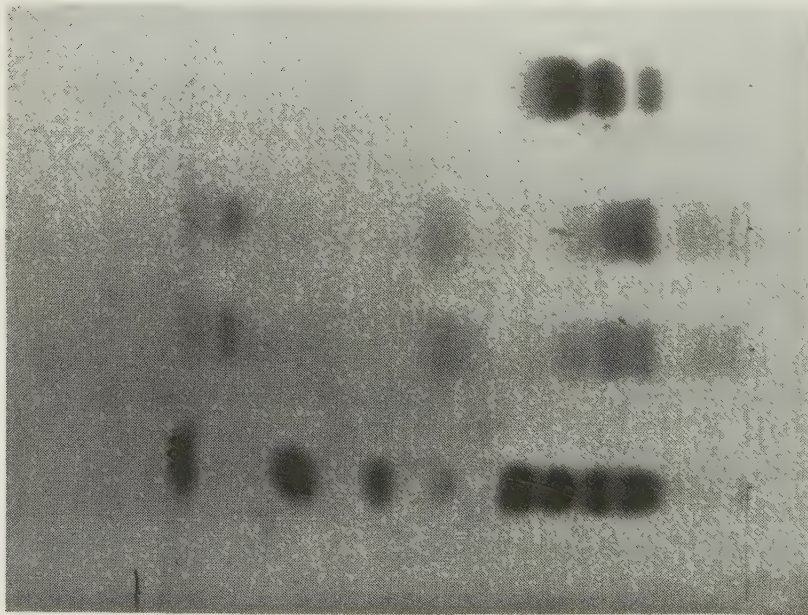
Indoxylacetat

Indoleacetyl-  
säure

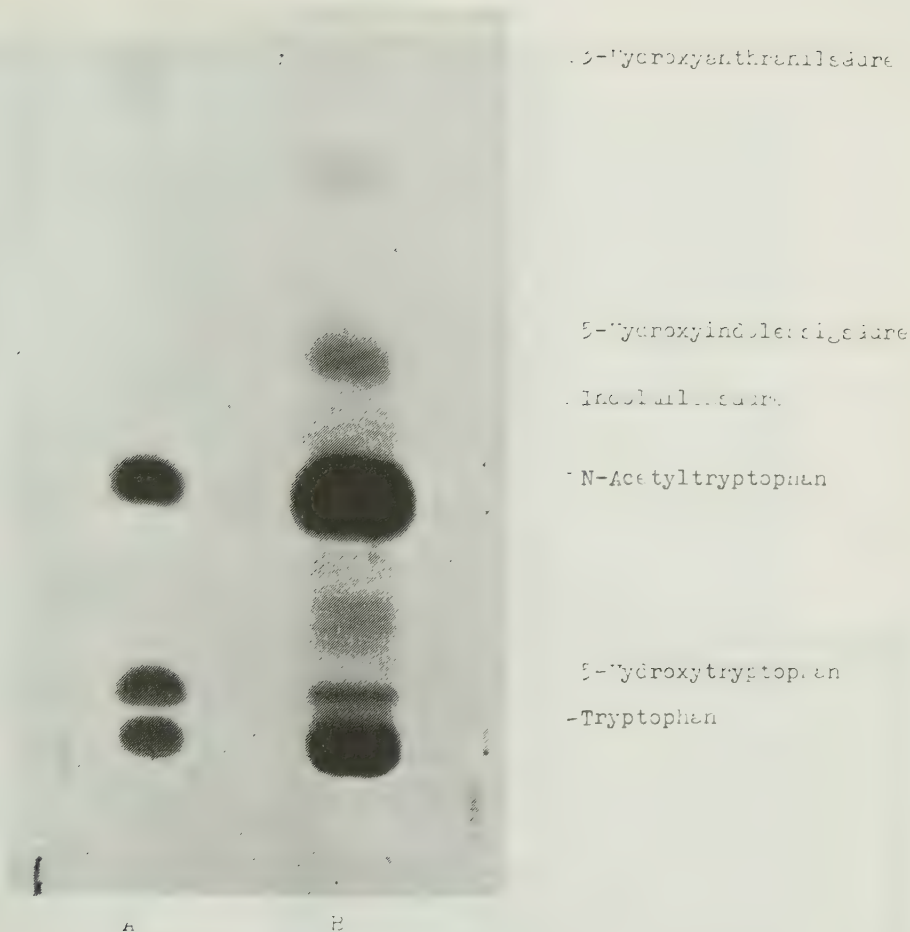
5-Indoleacetyl-  
säure

Tryptophan

5-Hydroxyindoleacetyl-  
säure



I II III IV V



- c. Ausschnitt eines Chromatogrammes bei Praecoma hepaticum.  
 Stark erhöhte Ausscheidung von N-Acetyltryptophan  
 A: 2  $\mu$ g Reinsubstanzen (I, II, XI, XIII) nach Tab. 1 )  
 B: 5  $\mu$ l Urinextrakt  
 Laufmittel: Ez-Pro- $^{20}$  Färbung: Xanthydrol-Reagenz  
 Identifizierung des N-Acetyltryptophans, der Indolmilchsäure  
 und der 3-Hydroxyanthranilsäure durch vergleichende Chroma-  
 tographie mit den Reinsubstanzen in den drei angegebenen Lau-  
 fmitteln und zwei Färbemethoden (Van Ura, Xanthydrol). Die nicht  
 bezeichneten Substanzen wurden nicht identifiziert.

- N-Acetyltryptophan

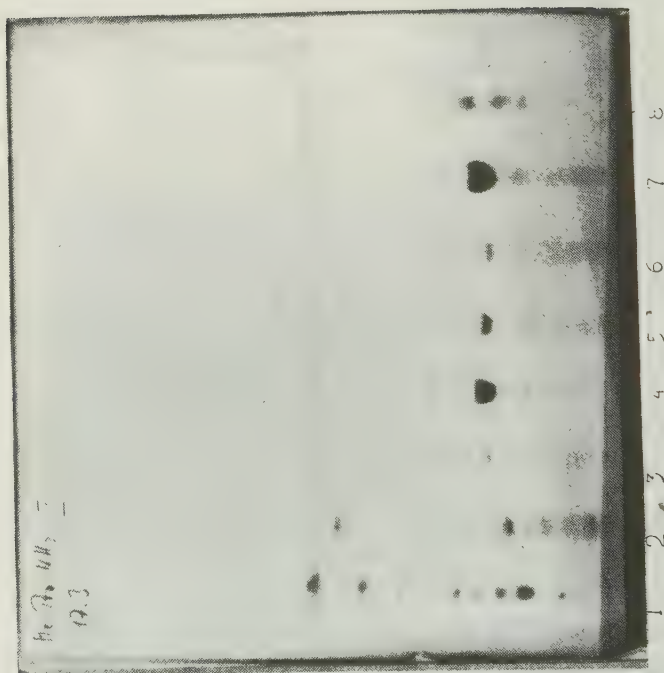


Abb.7 Seriensche chromatogramme von Urinen. 3-7 dekompensierter Lebercirrhose

1,8: Reinstanzgemische

2: Normalurinextrakt

3-7: Extrakte pathologischer Urine

Die Urine 3-7 zeigen eine deutliche bis massive Ausscheidung von

N-Acetyltryptophan. Identifizierung von N-Acetyltryptophan wie in Abb. 7  
Leufmittel: Me-Fr-NH<sub>2</sub> Farbung: Van Urk-Reagenz

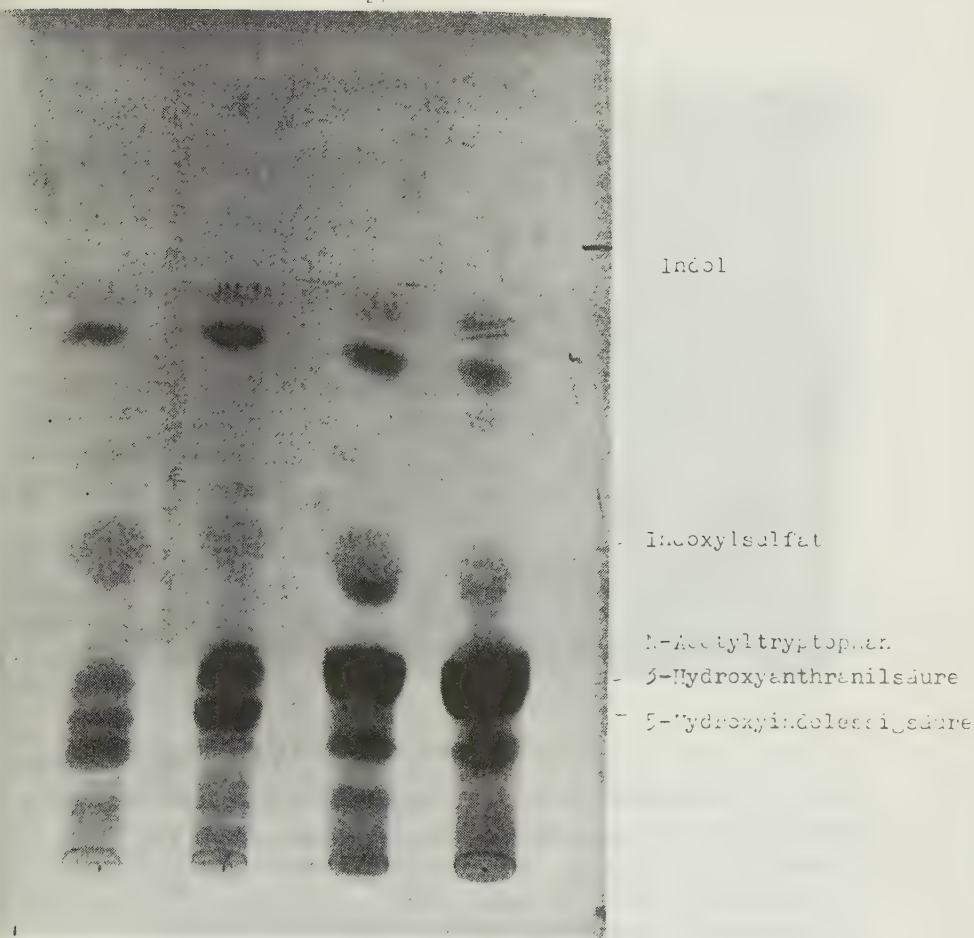


Abb. 8 Chromatogramm mit Harnextrakten von 4 Patienten mit portocavaler Enzephalopathie. Deutlicher Nachweis von N-Acetyltryptophan in allen Fällen.

Laufmittel: Me-Pr- $\frac{1}{3}$ , Entwicklung: Van. Urn-Reagens

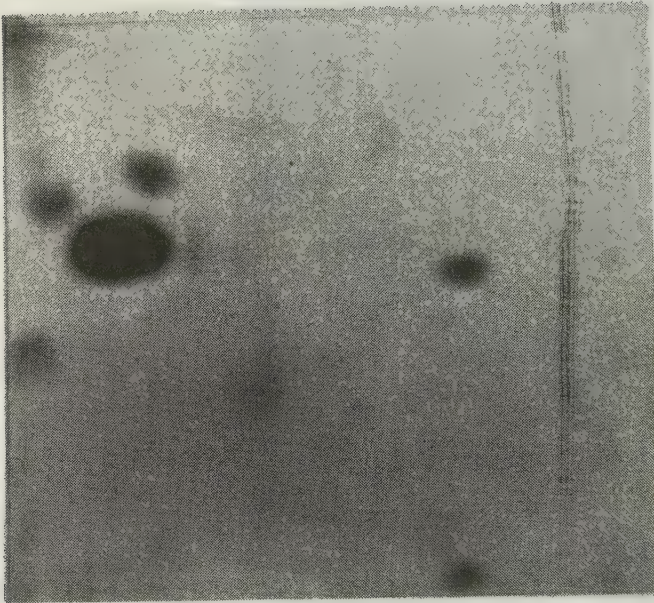


Abb. 9 Zweidimensionales Chromatogramm von Urinextrakt bei portocavaler Anastomose. Starke Ausscheidung von N-Acetyltryptophan von etwa 110 mg/die

1. Dimension Laufmittel  $\text{Me-Pr-NH}_3$

11. Dimension Laufmittel  $\text{Bz-Pro-H}_2\text{O}$

Färbung: Van Urk-Reaktion

Identifizierung siehe Abb. 6 und 7

Fall 1: Pat. E. S., 49 J., männlich

Der Patient, bei dem seit vier Jahren eine Lebercirrhose bekannt war, wurde am 9.1.72 stationär aufgenommen, da zu diesem Zeitpunkt massiver Ascites bestand. Am 13.1. wurde die Ausscheidung von N-Acetyltryptophan mit 70 mg/die bestimmt. Laborwerte zu diesem Zeitpunkt:  $\text{NH}_3\text{N}$  3.0  $\mu\text{g/ml}$ , Bilirubin 2.4 mg%, Es bestanden noch keine Zeichen einer Encephalopathie, diese traten aber am 19.1. auf. An diesem Tage waren N-Acetyltryptophan 130 mg/die und  $\text{NH}_3\text{N}$  3.5  $\mu\text{g/ml}$ . Am 8.3. verstarb der Patient im Coma hepaticum.

Fall 2: Pat. H. R., 74 J., weiblich

1963 wurde bei der Patientin eine Lebercirrhose festgestellt, 1964 und 1965 hatte sie Oesophagusvarizenblutungen. Seit Juni 1972 bestanden Ascites und Beinödeme. Im September wurde N-Acetyltryptophan mit 110 mg/die bestimmt. zu diesem Zeitpunkt waren  $\text{NH}_3\text{N}$  0.8  $\mu\text{g/ml}$ , Bilirubin 2.0 mg%, SGOT 62 U/l, SGPT 22 U/l, gamma-Globuline 35.5 rel.%. Im Oktober bekam die Patientin Zeichen einer Encephalopathie Stadium 1. N-Acetyltryptophan wurde mit 100 mg/die bestimmt,  $\text{NH}_3\text{N}$  1.0  $\mu\text{g/ml}$ , Bilirubin 2.5 mg%, SGOT 36 U/l, SGPT 21 U/l, gamma-Globuline 51 rel.%. Anfang Januar wurde die Patientin komatös und verstarb am 12.1.73.

Fall 3: Pat. K. B., 54 J., männlich

Bei dem Patienten wurde 1956 ein Leberleiden festgestellt und 1958 eine portocavale Anastomose angelegt. Seit dieser Operation bestanden bei dem Patienten

immer Zeichen einer portocavalen Encephalopathie Stadium 1. 1971 und 72 wurde die Ausscheidung von N-Acetyltryptophan mehrfach bestimmt, dabei lagen die Werte immer über 100 mg/die (Abb. 5). Während dieser Zeit war der Blutammoniak-Spiegel immer auf über 3 µg/ml erhöht, die Transaminasen waren mäßig erhöht, die gamma-Globuline lagen bei 30 rel.%. Am 9.5.72 verstarb der Patient im Coma hepaticum.

Fall 4: Pat. K. B., 60 J., männlich

Bei dem Patienten wurde 1964 eine Thorotrast-Schädigung der Leber festgestellt, die durch eine 1941 erfolgte Thorotrast-Angiographie bedingt war. Im Februar 1972 traten Oesophagusvarizen-Blutungen auf. Am 21.4 wurde bei dem Patienten eine portocavale Anastomose angelegt. Präoperativ war eine N-Acetyltryptophan-Ausscheidung nicht nachweisbar.  $\text{NH}_3\text{N}$  betrug 2.0 µg/ml, SGOT 13 U/l, SGPT 7 U/l, Bilirubin 0.8 mg%, gamma-Globuline 22 rel.%. Am 29.4. war N-Acetyltryptophan ebenfalls nicht nachweisbar. Dabei war  $\text{NH}_3\text{N}$  1.7 µg/ml, SGOT 30 U/l, SGPT 15 U/l, Bilirubin 1.7 mg%, gamma-Globuline 27.5 rel.%. Am 9. 5. betrug die Ausscheidung von N-Acetyltryptophan 70 mg/die,  $\text{NH}_3\text{N}$  betrug 1.8 µg/ml, SGOT 24 U/l, SGPT 15 U/l, Bilirubin 1.8 mg%, gamma-Globuline 39.5 rel.%. Zur gleichen Zeit hatte der Patient beginnende Zeichen einer Encephalopathie.

## Diskussion der Ergebnisse

Im Stoffwechsel des Tryptophans sind drei wichtige Abbauewege bekannt (Schema Nr. 1):

1. Der Weg Über Kynurenin und Hydroxyanthranilsäure zur Nicotinsäure
2. Der Abbau Über Tryptamin zur Indoleessigsäure
3. Umwandlung in Serotonin und Abbau zur 5-Hydroxy-indoleessigsäure

Im Harn Gesunder lassen sich mit der beschriebenen Methode sowohl die Ausgangssubstanz Tryptophan als auch die Endprodukte der unter 2. und 3. genannten Stoffwechselwege bestimmen, nämlich Indoleessigsäure und 5-Hydroxyindoleessigsäure. Die Metabolite des unter 1. genannten Stoffwechselweges müssen mit anderen Methoden nachgewiesen werden.

Bei der Lebercirrhose finden sich Veränderungen, wenn man das Indolmuster mit dem Gesunder vergleicht. Deutlich vermehrt sind hier Indolmilchsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure. Ergebnisse von Gholson et al. (20) zeigten, daß die 3-Hydroxyanthranilsäure ein obligates Intermediärprodukt auf dem Weg der kompletten Oxidation des Indolkerns des Tryptophans ist. Daher kann das Auftreten dieser Substanz im Sinne einer Blockierung des Hauptabbauewegs des Tryptophans zur Nikotinsäure bei Lebercirrhose aufgefasst werden. Indolmilchsäure wird ebenso wie Indolbrenztraubensäure als Metabolit des Bakterienstoffwechsels im Darm angesehen. Ihr Auftreten

könnte daher ebenso auf eine Stoffwechselblockade als auf eine verminderte Metabolisierung dieser Substanz in der Leber zurückgeführt werden.

Bei dekompensierter Leberinsuffizienz mit Encephalopathie erscheint N-Acetyltryptophan in großen Mengen im Harn. Alle Patienten zeigten zum Zeitpunkt des Auftretens von N-Acetyltryptophan Symptome einer dekompensierten Leberinsuffizienz wie Ascites, Ösophagusvarizen oder Ösophagusvarizen-Blutungen. Bei den meisten Patienten bestanden zu diesem Zeitpunkt auch Zeichen einer Encephalopathie. Wenn diese zunächst nicht vorhanden waren, so zeigten sie sich im weiteren Krankheitsverlauf nach einigen Tagen oder Wochen.

Die Patienten mit portocavaler Anastomose zeigten alle eine ausgeprägte Erhöhung der N-Acetyltryptophan-Ausscheidung. Wie Fall 4 zeigt, scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Anlegen einer portocavalen Anastomose und dem Nachweis von N-Acetyltryptophan zu bestehen. Hierbei ist die Umgehung des intrahepatischen Kreislaufes, wie er auch bei dekompensierten Cirrhosen in zunehmendem Maße einsetzt, der Grund für das Auftreten dieser Substanz. Belastungsversuche von Price und Brown (19) ergaben, daß N-Acetyltryptophan in geringerem Ausmaß als Tryptophan metabolisiert wird und zu einem geringeren Anteil in den Abbauweg zur Nicotinsäure eingeschleust wird, da es nicht deacetyliert werden kann. Sein Auftreten bei terminaler Leberinsuffizienz könnte ein Anzeichen dafür sein, daß bei Blockade der übrigen

Stoffwechselwege des Tryptophans das sich anstauende Tryptophan auf einem Nebenweg acetyliert und ausgeschieden wird.

Im Ganzen kann die Dünnschichtchromatographie der Indolderivate als aussichtsreiche Methode zur Beurteilung des Stoffwechselbildes Leberkranker, besonders bei Encephalopathie, angesehen werden. Änderungen während des Krankheitsverlaufes sowie in den einzelnen Krankheitsstadien sind noch zu prüfen.

### Zusammenfassung

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten wurde geprüft, ob bei beginnender und manifester Leberinsuffizienz Metabolite des Tryptophanstoffwechsels vermehrt oder neu auftreten und ob diese Befunde diagnostische Rückschlüsse erlauben.

Es wurden Harnproben von Gesunden, Patienten mit akuter Virushepatitis, chronischer Hepatitis und kompensierter Cirrhose, sowie mit Lebercirrhose und portocavaler Encephalopathie untersucht.

Harnproben wurden nach saurer Extraktion mit Äthylacetat in Isopropanol aufgenommen und auf Kieselgelplatten mit drei verschiedenen Laufmitteln eindimensional, in einigen Fällen auch zweidimensional chromatographiert. Die Identifizierung der im Harn nachgewiesenen Metabolite erfolgte durch Vergleich mit Reinsubstanzen, die mit Hilfe ihrer Rf-Werte in verschiedenen Laufmitteln und ihrer Anfärbung in verschiedenen Reagentien charakterisiert wurden.

Bei der Untersuchung der Harnextrakte liessen sich 18 Indolderivate identifizieren. Folgende Metabolite wurden bei Stoffwechselgesunden gefunden und liessen sich mit den verwendeten Methoden eindeutig auf-trennen:

5-Hydroxyindolessigsäure, 3-Indolessigsäure, Tryptophan, Serotonin und Indoxylsulfat.

Bei akuter Hepatitis konnten keine Veränderungen dieses

Metabolitmusters nachgewiesen werden.

Bei kompensierter Cirrhose wurden zusätzlich Indolmilchsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure gefunden. Die Ausscheidung von Anthranilsäure war quantitativ stark vermehrt, die Ausscheidung von Serotonin war deutlich herabgesetzt.

Bei Lebercirrhose mit portocavaler Encephalopathie und bei Patienten mit portocavaler Anastomose wurde zusätzlich in hohen Konzentrationen N-Acetyltryptophan nachgewiesen. Bei zwei Patienten, bei denen im Stadium der kompensierten Lebercirrhose dieser Metabolit ebenfalls gefunden wurde, trat nach kurzer Zeit eine Leberinsuffizienz mit portocavaler Encephalopathie Stadium 1-3 auf.

Es wird diskutiert, ob die Dünnschichtchromatographie der Tryptophanmetabolite zur Diagnostik der portocavalen Encephalopathie herangezogen werden kann.

Literaturverzeichnis

1. F. Hartmann, E. Freiberg und W. Ruge: Indolmuster im  
Urin Leberkranker  
Klin. Wschr. 46,14(1962)
2. J.E. Leklem: Quantitative aspects of tryptophan  
metabolism in humans and other species  
Am. J. clin. nutr. 24,659(1971)
3. Juan Sabater and Carmen Ricos: Abnormalities of  
tryptophan metabolism (kynurenine pathway) found  
in agroup of 830 mentally retarded children  
Clin. Chim. Acta 56(175-186) 1974
4. J.P. Jepson: Indolylacetylglutamine and other  
indole metabolites in Hartnup Disease  
Lancet ii,1009(1950)
5. C.E. Dalgliesh and S. Tekman: The excretion of  
kynurenine and 3-hydroxykynurenine by man  
Biochem. J. 56,485(1954)
6. D.P. Rose: The influence of sex,age,and breast  
cancer on tryptophan metabolism  
Clin. Chim. Acta 18,221(1967)
7. C. Hirayama: Tryptophan metabolism in liver  
disease  
Clin. Chim Acta 32,191(1971)
8. M. Piazza: Blockage of transformation of  
tryptophan to nicotinic acid  
Nature 191,601(1961)

9. B. Haverback, A. Sjoerdsma, and L.L. Terry: Urinary excretion of the serotonin metabolite 5-hydroxyindolacetic acid in various clinical conditions  
New Engl. J. Med. 255,270(1956)
10. S. Bessman, J.K. Merlus, and F. Borges: Effect of 5-hydroxytryptophane upon EEG in hepatic coma  
Proc. Soc. exp. Biol. 95,502(1957)
11. R.M. Donaldson, J. Arahehety, and S.J. Cray: In vivo studies of 5-hydroxyindole metabolism in patients with hepatic cirrhosis and in rats  
J. Clin. Invest. 38,933(1962)
12. M.D. Armstrong, K.N.F. Shaw, S. Gortakowski, and H. Singer: Indole acids of human urine  
J. Biol. Chem. 232,16(1958)
13. H. Sprince, C. Parker, J.T. Dawson, D. Jameson, and F.C. Dohan: Paper chromatography of urinary indoles extracted under alkaline and acid conditions  
J. Chromatog. 8,457(1962)
14. A. Stachow, B. Bousquet, et C. Dreux: Variation du rapport tryptamine/acide indoleacetique urinaire dans divers cas pathologiques affectant le metabolisme du tryptophane  
Clin. Chim. Acta 50,329-335(1974)
15. M.S. Dallas: Precision in the diect densitometry of couloured compounds on thin layer chromatograms  
J. Chromatog. 337-346(1968)

16. C.A. Benassi, F.M. Veronese, and A. De Antoni:  
On the determination of small amounts of tryptophane metabolites and their occurrence in normal urine  
Clin. Chim. Acta 17, 383 (1967)
17. F. Boyland and D.C. Williams: The metabolism of Tryptophane  
Biochem. J. 64, 578 (1956)
18. J.M. Rylance: The estimation of indoxyle sulphate in urine  
Clin. Chim. Acta 26, 99 (1966)
19. P. Baumann and M. Perey: The analysis of free tryptophan in human blood with the ultrafiltrator: a comparison with other methods  
Cli. Chim. Acta 76, 223-231 (1977)
20. C.E. Dalgliesh: Two-dimensional paper chromatography of urinary indoles and related substances  
Biochem. J. 64, 481 (1956)
21. E. Stahl und H. Kaldewey: Spurenanalyse physiologisch aktiver Indolderivate  
Z. Physiol. Chem. 323, 182 (1961)
22. J. Cotte, M. Chetaille, F. Poulet et J. Christiansen: Methode de séparation chromatographique bidimensionnelle sur couche mince des metabolites du tryptophane  
J. Chromatog. 19, 312 (1965)

23. C. Coolombel, C. Kissin, J.P. Durand, J. Cotte:  
Recherche de l'acide homogentisique par  
couch mince  
Clin. Chim. Acta 29,193(1970)
24. M.P. Walsh: Separation and estimation of tryptophan-  
nicotinic acid metabolites in urine by TLC  
Clin. Chim. Acta 2,263(1965)
25. C.C.J. Gibbs, S.J. Saunders, and C.D. Sweeney:  
Quantitative estimation of tryptophane in plasma  
and urine using TLC and induced fluorescence  
Clin. Chim. Acta 17,317(1967)
26. K. Breebart, A. M. F. H. Haan: Densitometric deter-  
mination of catecholamine metabolites and 5-hydroxy-  
indoleacetic acid after two-dimensional thin-  
layer chromatography on cellulose  
Clin. Chim. Acta 39,157-164(1972)
27. C. Dreux: Etudes sur la biochimie des methoxy-  
indoles  
Clin. Chim. Acta 30,519(1970)
28. R.K. Cholson, L.V. Hankes, and L.M. Henderson:  
3-hydroxyanthranilic acid as an intermediate in  
the oxidation of the indole nucleus of tryptophan  
J. Biol. Chem. 235,132(1960)
29. R.R. Brown and J.M. Price: Quantitative studies  
on human urinary metabolites of D-, DL-, Acetyl L-,  
and Acetyl D-Tryptophan  
Biochem. J. 62,985(1955)

30. C. Crepaldi and A. Parpajola: Excretion of tryptophan metabolites in different forms of haemoblastosis

Clin. Chim. Acta 9,106(1964)

## Lebenslauf

Am 10. Januar 1947 wurde ich in Solingen als zweiter Sohn des Kraftfahrers Heinrich Del Barba und seiner Ehefrau Johanna geb. Willms geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule Solingen Krahenhöhe.

Ab 1957 absolvierte ich meine Gymnasialzeit an dem Gymnasium Schwertstraße in Solingen und beendete diese mit der Reifeprüfung im Februar 1966.

Im Sommersemester 1966 begann ich mein Hochschulstudium an der Philipps-Universität Marburg.

Nach zwei Semestern Studium der Volkswirtschaftslehre führte ich mein Medizinstudium vom Sommersemester 1967 bis zur Beendigung meines Staatsexamens am 12. Dezember 1972 durch.

Nach Abschluß meiner Medizinalassistentenzeit in Marburg (Innere Medizin, Chirurgie, HNO) arbeitete ich von April bis September 1974 als Assistent eines niedergelassenen HNO-Arztes und danach eines Allgemeinmediziners.

Meine Approbation erhielt ich im September 1974. Seit Oktober 1974 arbeite ich als wissenschaftlicher Angestellter im Anaesthesie-Zentrum der Universitäts-Kliniken in Marburg.

Marburg, im März 1978

Friedrich Del Barba









